# HPLC Troubleshooting APP
# 赛默飞让您解决问题更容易

## 简介：

在一套新的 HPLC 方法开发过程中，往往会发生意想不到的状况：如除进样峰以外的所有色谱峰均为倒峰（图 1）。即使伴随着色谱技术的发展，许多问题得以解决，但一些出乎意料的问题还是会发生。您该怎样查明是哪里出现了问题，并快速解决掉呢？

尽管在互联网上充斥着许多关于高效液相色谱的疑难解答，但其中很大一部分是长达几十页的长篇大论。这些文章可能会对如何系统性地解决问题有所帮助，但当您需要一份快速的解决方案时，通过探究这些资料来获得您所需要的内容，往往费时又费力。

一种便捷的方式是使用海报，例如赛默飞 HPLC 液相维修指南海报，海报上所有的故障解决方案一目了然，可以帮助您快速解决问题。对于使用智能手机的客户，另一个理想的方式是在 iPhone®, Android™以及 Windows® 平台上下载赛默飞 HPLC Troubleshooting APP。此 APP 不仅包含了 HPLC 液相维修指南海报中的所有内容，并且还包括电化学及纳升液相色谱的解决方案，同时涵盖了电喷雾检测器（CAD）的解决方案，这些增加的内容使得 HPLC Troubleshooting APP 可以全方位解决各类系统的各种疑难杂症。

赛默飞 HPLC Troubleshooting APP 免费下载地址：http://info1.thermoscientific.com/forms/HPLC_Troubleshooting_App.

图 2　适用于 iPhone, Android, 以及 Windows 平台的赛默飞 HPLC Troubleshooting APP

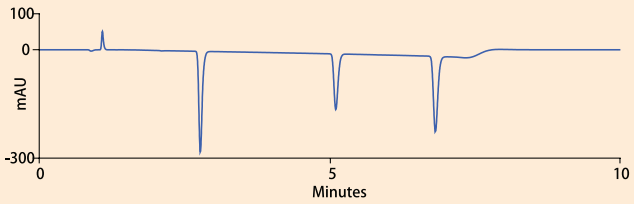


图 1　在方法开发实验中出现的倒峰

## 仪器系统：

- 赛默飞 UltiMate™ 3000 DGLC：
  - SRD-3600 溶剂架，配有六条脱气管路
  - DGP-3600RS 双梯度泵
  - WPS-3000TRS 温控孔板式自动进样器
  - TCC-3000RS 柱温箱
  - DAD-3000RS 二极管阵列紫外 - 可见光检测器，配有样品流通池
- 赛默飞 Chromeleon™色谱数据系统（CDS），7.1 版 SR1
- 所有仪器模块均使用内径为 0.005 英寸（0.13 毫米）的赛默飞 Viper™连接系统连接

## 色谱条件：

| | |
|---|---|
| 色谱柱：赛默飞 Acclaim™ 120 C18 色谱柱，5 µm, 4.6 × 100 mm | |
| 标准品：咖啡因，蒽，菲（0.05 mg/L）70% 乙腈溶液 | |
| 流动相：A：0.1% 甲酸的水溶液 | |
| B：0.1% 甲酸的乙腈溶液 | |
| 梯　度：时间（min） | %B |
| 0.0 | 60% |
| 5.0 | 90% |
| 5.5 | 90% |
| 6.0 | 60% |
| 10.0 | 60% |
| 流　速：1 mL/min | |
| 柱　温：30℃ | |
| 波　长：285 mm | |
| 带　宽：4 nm | |

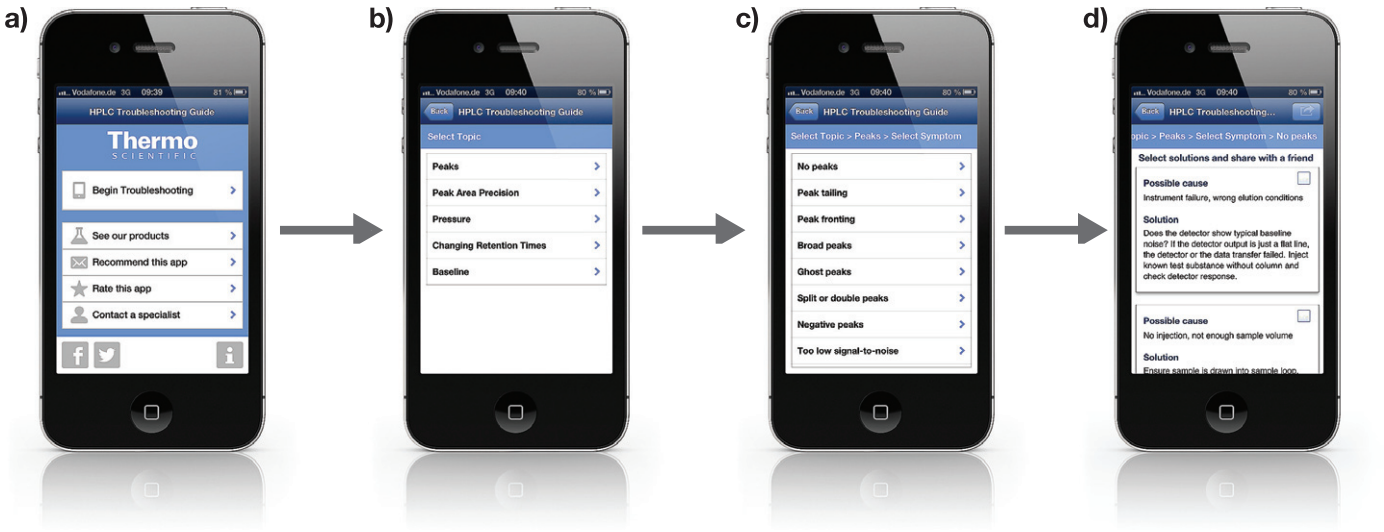


图 3　使用赛默飞 HPLC Troubleshooting APP 查找可能的问题原因

## 故障排除实例

### 轻松一点，找到问题根源

以之前所述的倒峰问题为例，按照以下步骤使用 HPLC Troubleshooting APP 找到问题的原因：

- 在 App 主屏幕选择“Begin troubleshooting”（图 3a）
- 由于问题关于色谱峰，因此选择“Peaks”（图 3b）
- 选择“Negative peaks”（图 3c）
- App 列举了 6 条“Possible cause / Solution”（图 3d），如表 1 所示

表 1　由 HPLC Troubleshooting APP 查到的原因

| Possible Causes |
|---|
| 1. Inappropriate reference wavelength setting (DAD) |
| 2. Absorption/fluorescence of analyte is lower than mobile phase |
| 3. Wrong polarization of analog output interface |
| 4. Drainage spiking (CAD) |
| 5. Fluorescence of the substance is quenched by matrix or mobile phase (FLD) |
| 6. Possible reduction occurring at electrode (ECD) |

## 可能的原因与解决方案的讨论

倒峰的产生可能是由于检测器或者检测信号处理过程所导致的。因此，针对不同类型的检测器会有不同的原因。在这个例子中不同原因被一一列举出，包括紫外检测器（可变波长，VWD）或者二极管阵列检测器（DAD）、模拟数据采集、荧光检测器（FLD）、电喷雾检测器（CAD）以及电化学检测器（ECD）。表明这款 HPLC Troubleshooting App 具有独特的多样性。

在这个实例中，实验结果由 DAD 检测器的数字信号产生。表 1 中的可能原因 3，4，5 和 6 与 ECD，CAD，模拟数据采集以及 FLD 检测器有关，因此并不适用。这样只剩下两条可能的原因。原因 1：不恰当的参比波长设置（DAD），HPLC Troubleshooting App 也指明了相应的解决办法（图 4）：

*The sample must not absorb in the range of the reference wavelength. If possible, use a method without reference wavelength.*

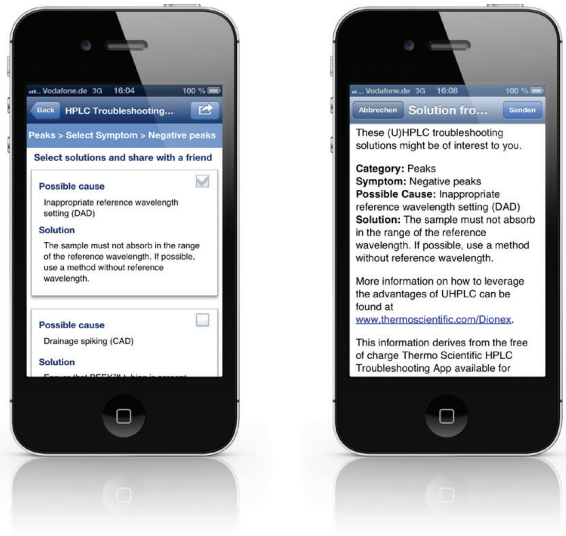


图 4　App 显示可能的原因“Inappropriate reference wavelength setting (DAD)”，并提供解决办法。同时值得注意的是，这款 App 具有与同事分享解决方案的功能，并提供链接让您进一步的深度探究。

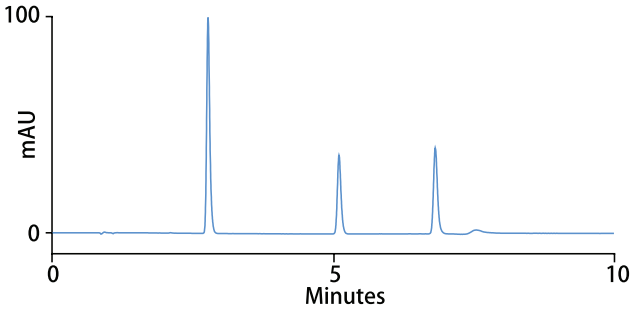


图 5　在没有参比波长的条件下（关闭参比波长）获得的色谱图，所得色谱峰均正常并排除了基线漂移及进样峰的影响。

使用紫外 - 可见 DAD 检测器，客户可以自由选择参比波长及检测波长。使用得当，参比信号能够改善基线漂移等状况。如果参比波长选择不当，待分析物在此波长范围内有吸收，则可能得到负的相应值即倒峰。（参见后面的“*您知道吗*”获得更多信息）

在这个实例中，被分析物质对羟基苯甲酸丁酯的参比波长及检测波长均未正确选择。

- 选择 240 nm 为参比波长，参比波长带宽 100 nm，则参比波长的吸收范围为 190 nm 到 290 nm
- 选择 285 nm 为检测波长，检测波长带宽 4 nm，则检测波长的吸收范围为 283 nm 到 287 nm

参比波长的确与检测波长的范围重叠了，这使得倒峰很可能会出现。为了验证这一结论，参比波长可以选择“关闭”。“关闭参比波长”实际上是赛默飞二极管阵列检测器（DAD）推荐操作，主要是为了避免不正确的参比波长设置而带来的影响。修改设置之后的色谱图（图 5）表明此操作能够立即解决出现倒峰的问题。

值得注意的是，进样峰与基线漂移现象同样消失。两者均是由作为流动相一部分的甲酸产生吸收所引起的，当波长低于 260 nm 时，便会产生影响。进样峰为正峰是由于样品稀释液没有甲酸，因此吸收值小于流动相。由于最初参比波长设置不正确，使得负峰倒转，从而出现了一个正峰。

在掌握了解决办法之后，下一步所做的即为优化紫外 - 可见波长 / 参比波长，并优化带宽值。

## 结论

几个简单的按键即可解决问题，选择您的疑问，HPLC Troubleshooting App 会帮助您找到答案。这款 App 囊括了多种特殊的色谱技术，例如荧光检测器、电喷雾检测器、电化学检测器以及纳升液相色谱技术等，这样一款性能强劲并且免费的工具可以使您有效地诊断 HPLC 分析过程中所产生的各种潜在问题。并且 HPLC Troubleshooting App 具有分享功能，您只需选择分享，从您的联系人列表中输入邮件地址即可与您的团队轻松分享解决方案。而通过相应的链接，您可进行进一步的深度探究。

## 您知道吗?

### 参比波长与检测波长的工作原理是什么?

### 参比波长

参比波长是为了校正（扣除）在分析过程中因条件改变而带来的吸收的影响。某些条件改变所产生的影响是十分显著的，例如检测器灯能量的衰减（基线漂移）。因此参比波长必须选择在分析样品没有吸收的光谱范围内。正是由于来自参比波长的信号会在检测波长所接收的信号内扣除，因此会直接影响所得结果。

### 参比波长带宽

参比波长带宽为参比波长平均上下浮动的二极管信号范围。参比波长带宽的选择应尽可能广，例如 30-100 nm，但必须限定在不影响待测物吸收波谱范围内。图 6 表明了对羟基苯甲酸丁酯光谱范围内参比波长的正确选择。

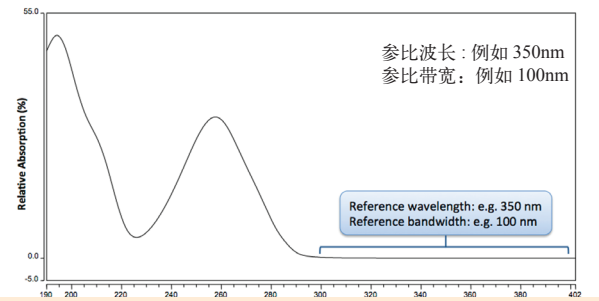


图 6　对羟基苯甲酸丁酯吸光度谱图及推荐的参比波长设置。

### 紫外 – 可见检测波长

与参比波长相比，用于记录检测物质吸光度的紫外 - 可见检测波长，应当设定在待测物的最大吸收波长处[5]。

## 免费下载 HPLC Troubleshooting App

此 App 在 iPhone, Android, 以及 Windows 手机平台上通用，免费下载地址：

http://info1.thermoscientific.com/forms/HPLC_Troubleshooting_App

同时您还可以扫描以下二维码，轻松下载 HPLC Troubleshooting App

Thermo SCIENTIFIC

Part of Thermo Fisher Scientific